

Gene therapy of mitochondrial diseases using a mouse model : quantity control of mitochondrial DNA results in quality control of mitochondrial function

著者	西山 哲史
内容記述	Thesis (Ph. D. in Science)--University of Tsukuba, (A), no. 5579, 2010.12.31 Includes bibliographical references (leaves 27-32)
発行年	2010
URL	http://hdl.handle.net/2241/114613

氏 名 (本籍)	にし やま さと し 西 山 哲 史 (東 京 都)
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 5579 号
学位授与年月日	平成 22 年 12 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科
学 位 論 文 題 目	Gene Therapy of Mitochondrial Diseases Using a Mouse Model: Quantity Control of Mitochondrial DNA Results in Quality Control of Mitochondrial Function (マウスを用いたミトコンドリア病の遺伝子治療：ミトコンドリア DNA 量の 制御によるミトコンドリア呼吸機能の回復)
主 査	筑波大学教授 理学博士 林 純 一
副 査	筑波大学教授 (連) 理学博士 米 川 博 通
副 査	筑波大学准教授 博士 (理学) 中 田 和 人
副 査	筑波大学教授 理学博士 沼 田 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

ミトコンドリアは細胞内において好気呼吸を担うオルガネラであり、その内部に約 16 kbp のミトコンドリア DNA (mtDNA) を持つ。mtDNA は細胞内に 1,000 ～ 10,000 コピー存在し、特定の点突然変異や欠失突然変異を持つ mtDNA が細胞内に蓄積すると、ミトコンドリアの呼吸活性が低下する。その結果、個体においては「ミトコンドリア病」と総称される、多様な疾患を引き起こすことがヒトの臨床症例として報告されている。病原性変異型 mtDNA によるミトコンドリア活性の低下は、細胞内における変異型 mtDNA がある一定の割合を超えることによって起こり、この現象は閾値効果として知られている。例えば、約 5 kbp に渡る領域が欠失した mtDNA を持つマウス培養細胞においては、その割合が約 80% を超えない範囲では正常な呼吸活性を保ち、それを超えたときに初めて活性の低下が起こることが報告されている。

現在までに、ミトコンドリア病に対する治療方法は、主に変異型 mtDNA の割合を減らすことを目的として、いくつかのアプローチが提案されている。しかしそれらは、適用可能な変異の型がたった一つの塩基置換に限られているものや、生体への適用が原理的に不可能であるものなど、極めて限定的な方法となっている。このような状況の中で、現在ミトコンドリア病患者に対してはビタミンや抗酸化剤の投与などの対症療法が適用されているのみであり、有効な治療法の確立には至っていない。

本研究では、mtDNA コピー数の増加によるミトコンドリア活性の回復という新しい遺伝学上のコンセプトに基づいたミトコンドリア病の治療方法を提案し、ミトコンドリア病モデルマウスの治療を試みた。ミトコンドリア活性の閾値効果を、変異型 mtDNA の割合ではなく野生型 mtDNA の絶対量に焦点をあてて考えると、細胞内に 1,000 コピーの mtDNA があるとした場合、野生型の mtDNA が 200 コピーを下回ったときに呼吸活性が低下することになる。この細胞の総 mtDNA 量を 2 倍の 2,000 コピーに増やすことが可能であれば、仮に変異型 mtDNA の割合が 90% であったとしても、200 コピーの野生型 mtDNA が維持され、そこから正常な遺伝子産物が提供され、呼吸活性を維持できると考えられる。

上記仮説を実証するため、本研究ではまず *Tfam*/EGFP 融合遺伝子を全身で高発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。*Tfam* は mtDNA の複製、転写、安定化に関わる遺伝子で、*in vivo* で高発現させると mtDNA コピー数が増加することが知られている。この Tg マウスにおいても、野生型マウスと比較して mtDNA コピー数が増加していることが Real-Time PCR 法により確認された。そこで、大規模欠失型 mtDNA (Δ mtDNA) を持つミトコンドリア病モデルマウス (mito-mouse) と Tg マウスとを交配して F₁ マウス (Tg-mito-mouse) を得て、解析を行った。

Tg-mito-mouse は、平均で mito-mouse の 1.74 倍の mtDNA を持っており、また特に Δ mtDNA の割合の高い個体の心筋、腎臓、骨格筋で、欠失部位にコードされている tRNA^{ser(ACT)} の存在量が mito-mouse と比較して増加していることが確認された。mito-mouse の多くで直接の死因となる腎機能障害については、Tg-mito-mouse では血中尿素窒素値の上昇が大きく抑えられ、また腎臓の浮腫の抑制、尿細管拡張の解消が観察された。また心筋、腎臓の切片を COX (Cytochrome c Oxidase) 染色法により解析した結果、ミトコンドリア呼吸機能活性の回復が認められた。mito-mouse と Tg-mito-mouse との心筋切片からマイクロダイセクション法により単一筋繊維の呼吸活性と Δ mtDNA の割合との関係を解析した結果、mito-mouse では Δ mtDNA の割合が 80% を超えた繊維は呼吸活性を持たなかったのに対し、Tg-mito-mouse では Δ mtDNA を 90% 持ちながらも正常な呼吸活性を保つ細胞が存在した。そして Tg-mito-mouse においては、寿命にも 54% 程度の延長効果が見られた。これらの結果は、*Tfam* 高発現による mtDNA 量の増加が、ミトコンドリア病の症状の改善に有効であることを示唆している。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では欠失型変異を持つ mtDNA によるミトコンドリア病モデルの治療を試み、一定の効果を示した。この治療コンセプトは、これまで治療アプローチの無かった生体への適用も可能であると考えられる。また、本研究においてはトランスジェニック法を用いて mtDNA 量を増加させたが、近年、血中の遊離脂肪酸や Ca²⁺ イオン、また一部のサイトカインが mtDNA 量の増加や *Tfam* 発現の活性化に働くことが報告されている。これらのメカニズムを解明することで、ミトコンドリア病治療へ向けた新しい創薬への応用が期待できる。よって、本論文は学問的価値が高いと判断できる。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。